



**ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**INFECÇÃO POR MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS (HEMOPLASMAS) EM GATOS DE  
LUANDA, ANGOLA**

**Frederico Miguel Neves**

**Coimbra, Março de 2019**



**ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**INFEÇÃO POR MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS (HEMOPLASMAS) EM GATOS DE  
LUANDA, ANGOLA**

**Coimbra, Março de 2019**

**Frederico Miguel Neves**

Aluno do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**Constituição do Júri**

*Presidente do Júri:* Prof. Doutora Ana Calado

*Arguente:* Prof. Doutora Ana Catarina Figueira

*Orientador:* Prof. Doutora Inês Crespo

**Orientador Interno**

Prof. Doutora Inês Crespo

**Co-orientador Interno**

Mestre Hugo Vilhena

Mestre Patrícia Ferreira Barradas

**Orientador Externo**

Dr. André Caldeira Santos

(Centro Veterinário de Cantanhede)

**Dissertação do Estágio Curricular do ciclo de estudo conducente ao Grau de Mestre em  
Medicina Veterinária da EUVG**

Aos meus filhos  
Aos meus pais  
À Maria

## **Agradecimentos**

À Professora Doutora Inês Crespo por ter aceite ser minha orientadora, pela sua disponibilidade, pelo seu profissionalismo, pelo apoio prestado na realização deste trabalho.

Ao Dr. Hugo Vilhena por ter aceite ser meu co-orientador, pela sua disponibilidade, pela sua dedicação e profissionalismo e pelo apoio prestado na realização deste trabalho.

À Dra. Patrícia Barradas pela disponibilidade, simpatia e partilha de conhecimentos prestados durante a realização dos diagnósticos moleculares no Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Ao Dr. André Caldeira Santos pela disponibilidade, partilha de conhecimentos e, acima de tudo, pela amizade.

À Dra. Ana Cristina Oliveira, Dra. Maria Francisca Luz e Dra. Sara Granada da Clínica Veterinária Casa dos Animais, Luanda, por facultarem as amostras e os dados clínicos dos animais incluídos no estudo.

À Professora Doutora Fátima Gärtner e à Professora Doutora Irina Amorim do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto (ICBAS-UP) pela colaboração na realização das técnicas de diagnóstico molecular das amostras dos animais incluídos no estudo.

## Índice geral

Índice de tabelas.....	viii
Lista de abreviaturas e siglas.....	ix
Folha de título.....	1
Resumo.....	2
<i>Abstract</i> .....	3
1.Introdução.....	4
2. Enquadramento teórico.....	4
2.1. Etiologia.....	4
2.2. Morfologia.....	5
2.3. Estudo genómico dos hemoplasmas.....	5
2.4. Prevalência.....	5
2.5. Fatores de risco.....	7
2.6. Modos de transmissão.....	7
2.7. Patogenia e sinais clínicos.....	8
2.7.1 <i>Mycoplasma haemofelis</i> .....	8
2.7.2. “ <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ”.....	9
2.7.3. “ <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> ”.....	9
2.7.4. O estado de portador.....	10
2.8. Alterações Laboratoriais.....	10
2.8.1 Hematologia.....	10
2.8.2. Bioquímica sanguínea.....	10
2.8.3. Análise de urina.....	10
2.8.4. Teste de Coombs.....	11
2.8.5. Esfregaço sanguíneo.....	11

2.9. Diagnóstico.....	11
2.10. Tratamento.....	12
<b>3. Trabalho experimental.....</b>	<b>13</b>
3.1. Materiais e métodos.....	13
3.2. Resultados.....	15
<b>4. Discussão.....</b>	<b>16</b>
<b>5. Conclusão.....</b>	<b>17</b>
<b>6. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>18</b>
<b>Apêndice 1 – Questionário</b>	

## **Índice de Tabelas**

Tabela 1 - Prevalência a nível mundial de hemoplasmas.....	6
Tabela 2 - Fatores de risco de infecção por hemoplasmas.....	7
Tabela 3 – Caracterização da população de gatos incluídos no estudo.....	14



## **Índice de abreviaturas e siglas**

CMhm - “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”

CMhp - “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*”

CMtc - “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”

Hb - Hemoglobina

Ht - Hematócrito

*Mhc - Mycoplasma haemocanis*

*Mhf - Mycoplasma haemofelis*

PCR - Reação em cadeia da polimerase (do Inglês *Polymerase Chain Reaction*)

## **INFEÇÃO POR MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS (HEMOPLASMAS) EM GATOS DE LUANDA, ANGOLA**

Frederico M. Neves <sup>a</sup>, Patrícia Ferreira Barradas <sup>b</sup>, Hugo Vilhena <sup>a,c,d</sup>, Inês Crespo <sup>a</sup>,

<sup>a</sup>Departamento de Medicina Veterinária (DMV)/Centro de Investigação Vasco da Gama (CIVG), Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário- Bloco B, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal ([fredericomiguelneves@gmail.com](mailto:fredericomiguelneves@gmail.com), [hcrvilhena@hotmail.com](mailto:hcrvilhena@hotmail.com), [ines.r.crespo@gmail.com](mailto:ines.r.crespo@gmail.com))

<sup>b</sup>Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto (ICBAS-UP), Rua Jorge Viterbo Ferreira, 228, 4050-313, Porto, Portugal ([patriciaferreirabarradas@gmail.com](mailto:patriciaferreirabarradas@gmail.com))

<sup>c</sup>Hospital Veterinário do Baixo Vouga, EN 1, 355, Segadães, 3750-742 Águeda

<sup>d</sup>Centro de Investigação Animal e Veterinária (CECAV), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Quinta de Prados, 5001-801, Vila Real

## Resumo

Ao longo dos últimos anos foram realizados diversos estudos sobre infecção por hemoplasmas em felinos domésticos com o objetivo de determinar a prevalência de infecção, fatores de risco associados e qual o seu significado na saúde dos felinos. Estão descritos cinco agentes capazes de infetar os gatos domésticos – *Mycoplasma haemofelis*, “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”, “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”, “*Candidatus Mycoplasma hematoparvum*” e *Mycoplasma haemocanis*. Apesar de a infecção por hemoplasmas em gatos estar descrita a nível global, que tenhamos conhecimento tal informação não está disponível em gatos de Angola.

O presente estudo teve como objetivo principal determinar, através do método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional e Sequenciação Genética, a prevalência de infecção por hemoplasmas em gatos de Luanda, Angola. Este estudo pretendeu ainda identificar fatores de risco para a infecção por hemoplasmas em gatos de Angola.

Foram analisadas amostras de 67 gatos domésticos. Foi detetado *Mycoplasma* spp., nomeadamente “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” em quatro amostras (6%). O número reduzido de animais infetados não tornou possível a identificação de fatores de risco associados à infecção.

Embora a prevalência identificada seja relativamente baixa, quando comparada com estudos de prevalência realizados noutras áreas geográficas, a interpretação deve ser cuidada na medida em que a amostra estudada apresenta características que, à partida, lhe conferem menor risco de exposição aos agentes em estudo. Ainda assim, o presente estudo descreve, pela primeira vez, a infecção por micoplasmas hemotrópicos em gatos de Angola.

**Palavras chave:** Angola, “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”, “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”, felino, hemoplasmas, *Mycoplasma haemofelis*.

## Abstract

During the last years, several studies on feline infection with hemoplasmas have been performed, aiming to determine the prevalence of infection, associated risk factors and their significance in feline health. Five agents have been described as capable of infecting domestic cats - *Mycoplasma haemofelis*, “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”, “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”, “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*” and *Mycoplasma haemocanis*. Although hemoplasma infection in cats was described globally, to our best knowledge that information is not available in cats from Angola.

The present study aimed to determine through conventional Polymerase Chain Reaction (PCR) and Genetic Sequencing, the prevalence of hemoplasma infection in cats from Luanda, Angola. This study also aimed to identify risk factors for hemoplasma infection in cats from Angola.

Samples from 67 domestic cats were analyzed in this study. *Mycoplasma* spp., specifically “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”, was detected in four samples (6%). The reduced number of infected animals detected in the present study prevented to identification of risk factors associated with the infection.

Although the identified prevalence was relatively low when compared with other studies conducted in other geographical areas, the interpretation of these results should consider that the population studied had characteristics that confer less risk of exposure to the agents under study. Nevertheless, the present study describes, for the first time, the infection by hemotropic mycoplasmas in cats from Luanda, Angola.

**Keywords:** Angola, “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”, “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”, feline, hemoplasmas, *Mycoplasma haemofelis*.

## 1. Introdução

A hemoplasmosse felina é uma doença cujo espectro de apresentação pode variar desde uma infeção subclínica até ao desenvolvimento de anemia hemolítica potencialmente fatal. A doença é provocada por bactérias Gram-negativas do género *Mycoplasma* capazes de parasitar os eritrócitos. Até à data estão identificadas cinco espécies capazes de infetar os gatos domésticos (*Mycoplasma haemofelis*, “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”, “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”, “*Candidatus Mycoplasma hemato-parvum*” e *Mycoplasma haemocanis*), algumas com potencial zoonótico. Estudos de prevalência têm vindo a reportar a sua presença a nível mundial. O presente estudo procura identificar, pela primeira vez, a presença de *Mycoplasma* spp. em gatos domésticos de Luanda, Angola, através do método da reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*) convencional e posterior sequenciação de ADN.

## 2. Enquadramento teórico

### 2.1. Etiologia

Os micoplasmas hemotrópicos são bactérias Gram-negativas, desprovidas de parede celular, que parasitam a superfície de eritrócitos (Reynolds & Lappin, 2007; Willi et al., 2007b; Messick, 2004; Martínez-Díaz et al., 2013).

Inicialmente foram consideradas como espécies dos géneros *Eperythrozoon* e *Haemobartonella*, pertencentes à ordem Rickettsiales (Sykes, 2010) pelo seu pequeno tamanho, por não serem cultiváveis em laboratório, por se suspeitar que a sua transmissão ocorria através de vetores artrópodes e por apresentarem tropismo para eritrócitos de uma grande variedade de mamíferos (Barker & Tasker, 2013). Estas características poderiam aproximá-los da família Anaplasmataceae, no entanto, o facto de não possuírem parede celular e aderirem à superfície dos eritrócitos sem os invadir, tornava esta classificação controversa (Neimark, Johansson, Rikihisa & Tully, 2001). Em gatos, foram inicialmente descritas duas espécies do género *Haemobartonella*: *Haemabartonella felis* forma grande ou variante Ohio e *Haemabartonella felis* forma pequena ou variante Californiana, com cerca de metade do tamanho da primeira e com menor virulência.

Posteriormente, a análise filogenética baseada na amplificação e sequenciação da subunidade 16S do RNA ribossómico, levou à reclassificação dos géneros *Haemobartonella* e *Eperythrozoon* no género *Mycoplasma*, classe Mollicutes. A espécie até então conhecida como *Haemobartonella felis*, variante grande ou Ohio, foi reclassificada como *Mycoplasma haemofelis* (Mhf), e a variante pequena ou Californiana da *Haemobartonella felis* passou a ser designada de “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” (CMhm) (Neimark et al., 2001). Estudos epidemiológicos posteriores levaram à identificação e reconhecimento de uma nova espécie capaz de infetar os gatos,

designada de “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” (CMtc) (Willi et al., 2005). As espécies “*Candidatus Mycoplasma hematonparvum*” (CMhp) e *Mycoplasma haemocanis*, mais frequentemente descritas em cães, foram também já descritas em gatos (Sykes et al., 2004; Bergmann et al., 2017).

## **2.2. Morfologia**

A microscopia eletrônica possibilitou a caracterização morfológica dos hemoplasmas (Messick, 2004; Willi et al., 2011). Estas bactérias possuem entre 0,3-0,9 µm de diâmetro e são polimórficas. São células anucleadas, possuem pequenos grânulos, filamentos citoplasmáticos e são revestidas por uma membrana celular. Ficam aderidas à superfície dos eritrócitos através de fibrilas, formando ligeiras indentações à superfície dos mesmos, sem os penetrar (Messick, 2004).

## **2.3. Estudo genómico dos hemoplasmas**

Os micoplasmas, grupo onde os hemoplasmas se inserem, são providos de um genoma cujo tamanho varia entre 580 e 2000 kb. Acredita-se que os hemoplasmas, através de processos evolutivos, mantenham apenas aqueles genes que lhes permitem sobreviver sob um modo de vida parasita dependente de uma célula hospedeira, o eritrócito (Messick, 2004). O mapeamento genético do *Mhf* permitiu identificar um grande número de genes responsáveis por processos de replicação, divisão celular, transcrição e translação, proteção contra stress oxidativo, produção de adesinas e formação de antígenos de superfície (Santos et al., 2011). Como referido anteriormente, a sobrevivência dos hemoplasmas está dependente da capacidade de parasitar o eritrócito, aderindo à sua superfície, do qual retiram todo o suporte nutricional composto por aminoácidos, ácidos gordos, colesterol e vitaminas (Messick, 2004).

## **2.4. Prevalência**

A presença destes hemoplasmas tem sido demonstrada a nível global, tanto em gatos domésticos como em felídeos selvagens ao longo dos últimos anos. As prevalências descritas em estudos epidemiológicos (Tabela 1) variam entre os 4% e os 43% de acordo com a região e amostras estudadas. Na maioria dos estudos apresentados, o CMhm é o agente mais prevalente.

Tabela 1 - Prevalência a nível mundial de hemoplasmas

	<i>Mhf</i>	<i>CMhm</i>	<i>CMtc</i>	<i>CMhp</i>	<i>Mhf</i> + <i>CMhm</i>	<i>Mhf</i> + <i>CMtc</i>	<i>CMhm</i> + <i>CMtc</i>	<i>Mhf</i> + <i>CMhm</i> + <i>CMtc</i>	Hemo- plasma spp.
<b>Brasil</b> (Miceli et al., 2013)	2,1%- 31%	4%- 13,5%	0,37% - 2,7%						
<b>Reino Unido</b> (Peters, Helps, Willi, Hofmann-Lehmann & Tasker, 2008)	2,8%	11,2%	1,7%		0,7%	0,1%	0,6%	0,1%	
<b>Itália</b> (Gentilini et al., 2009)	5,9%	17,3%	1,3%						18,9%
<b>Nova Zelândia</b> (Jenkins, Dittmer, Marshall & Tasker, 2013)	7,5%	25%	4,5%		5,5%		0,5%		31%
<b>Estados Unidos</b> (Sykes, Terry, Lindsay & Owens, 2008)	4,8%	23,2%	6,5%		1,6%	1%	3,2%	0,6%	27%
<b>Alemanha</b> (Bauer, Balzer, Thure & Moritz, 2008)	4,5%	22,5%			0,8%				
<b>Canadá</b> (Kamrani, Parreira, Greenwood & Prescott, 2008)	0,7%	3,3%							4%
<b>Portugal</b> (Martínez-Díaz et al., 2013)	1,25%	26,9%	0,6%	4,37% (+Myc spp)	10,3%				43,43%
<b>Chile</b> (Vergara et al., 2016)	4,4%	7,8%	2%	0,5% (+Myc spp)	0,8%		0,5%		15,1%
<b>Espanha</b> (Roura et al., 2010)	2,1%	7,9%	0,5%		1,6%		0,5%		12%
<b>Espanha</b> (Díaz-Reganon et al., 2018)	3,7%	8,1%	0,5%		1,2%		0,33%		10,6%
<b>África do Sul</b> (Lobetti & Lappin, 2012)	3,9%	21,6%							25,5%
<b>Japão</b> (Tanahara et al., 2010)	2,4%	15,8%	2,7%		1,6%	0,3%	2,8%	0,8%	26,4%
<b>Suíça</b> (Willi et al., 2006)	2,5%	15,7%	1,1%				0,6%		
<b>Irão</b> (Ghazisaeedi et al., 2014)	8%	6%	1%		4%	1%	1%	1%	22%

*CMhm* – “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”; *CMhp* – “*Candidatus Mycoplasma hemato-parvum*”; *CMtc* – “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”; *Mhf* – *Mycoplasma haemofelis*.

## 2.5. Fatores de risco

Para além da determinação da prevalência de infeção por hemoplasmas, também têm sido avaliados possíveis fatores de risco de infeção por hemoplasmas. Os fatores mais frequentemente associados à infeção por hemoplasmas (Tabela 2) são o género masculino, a idade adulta, um estilo de vida *outdoor* ou com acesso ao exterior e as infeções com retrovirus.

Tabela 2 – Fatores de risco de infeção por hemoplasmas

	Género M/F	Idade	Raça	Estilo de vida	FIV	FeLV	Estação do ano
Jenkins et al., 2013	M	>10A (CMhm)	nd		+		
Duarte et al., 2014	M (CMtc)			Gatil	+		
Ghazisaeedi et al., 2014	M	>8A					
Vergara et al., 2016	M	>2A		Outdoor	+		
Bergmann et al., 2017	M			Outdoor	+	+	
Díaz-Reganon et al., 2018	M	Adultos		Outdoor	+	+	Meses quentes

A – anos; F – feminino; FeLV – *Feline Leukemia Virus*; FIV – *Feline Immunodeficiency Virus*; M – masculino; nd – não definido.

## 2.6. Modos de transmissão

Embora o modo de transmissão natural de hemoplasmas entre animais ainda não esteja totalmente compreendido, são várias as vias sugeridas por diversos autores.

A transmissão por vetores artrópodes, nomeadamente através da pulga da espécie *Ctenocephalides felis* e carraças do género *Ixodes* são as mais frequentemente referidas em diversos estudos (Taroura et al., 2005; Woods, Brewer, Hawley, Wisnewski & Lappin, 2005; Willi et al., 2007a; Baumann et al., 2013; Díaz-Reganon et al., 2018), embora alguns estudos apresentem resultados que põem em causa esta mesma via (Jensen, Lappin, Kamkar & Reagan, 2001; Willi et al., 2007b), indicando outras vias de transmissão natural.

A transmissão horizontal entre animais dar-se-á mais provavelmente por interações agressivas, em que existe o risco acrescido de exposição a sangue contaminado e não por *grooming* (Willi et al, 2007a; Museux et al., 2009; Sykes, 2010; Baumann, Novacco, Riond, Boretti & Hofmann-



Lehmann, 2013; Fard, Vahedi & Mohammadkhan, 2014).

A transmissão através de transfusão sanguínea está documentada (Berent, Messick & Cooper, 1998; Gary, Richmond, Tasker, Hackett & Lappin, 2006), pelo que será recomendado fazer um rastreio a gatos dadores de sangue (Wardrop et al., 2016).

A transmissão vertical durante a gravidez, parto ou lactação é uma possibilidade sustentada por alguns autores (Bergmann et al., 2017), embora nunca tenha sido documentada experimentalmente. No entanto, outros autores rejeitam esta via de transmissão (Tanahara et al., 2010).

Foi ainda teorizada a possibilidade de transmissão interespécies, entre animais selvagens e domésticos, assim como entre animais domésticos e humanos (Neimark et al, 2001), tendo já sido descrita a infeção por hemoplasma semelhante a *Mhf* num homem adulto imunodeprimido após infeção por Vírus da Imunodeficiência Humana, que convivia com dois gatos infetados por *Mhf* (Santos et al., 2008).

## **2.7. Patogenia e Sinais Clínicos**

A infeção manifesta-se de diversas formas, sendo que os sinais clínicos dependerão da espécie de hemoplasma envolvida, da fase da infeção, da existência de doença concomitante e de outros fatores como o stresse. O espetro de apresentação dos animais infetados por hemoplasmas poderá variar desde uma infeção subclínica a uma anemia severa e potencialmente fatal (Willi et al., 2007b).

A adesão do agente ao eritrócito desencadeia um conjunto de eventos que irão originar o seu desaparecimento prematuro, nomeadamente o aumento de fragilidade osmótica do eritrócito e a formação de anticorpos antieritrocitários (Maede & Hata, 1975; Zulty & Kociba, 1990).

### **2.7.1. *Mycoplasma haemofelis* (*Mhf*)**

O *Mhf* origina um quadro clínico mais severo em gatos jovens, provavelmente por apresentarem um sistema imunitário ainda imaturo (Sykes et al., 2008). Regista-se maior incidência de infeção por *Mhf* em gatos machos mais velhos, o que poderá resultar de uma maior exposição a outros gatos e a comportamentos agressivos que potenciam uma maior possibilidade de contacto com o agente (Messick & Harvey, 2011). Existem, no entanto, outros estudos que contrariam estas evidências, relatando maior incidência deste agente nas populações de gatos com idade inferior a 3 anos (Sykes et al., 2008; Jenkins et al., 2013).

O *Mhf* é considerado o micoplasma hemotrópico felino mais patogénico (Foley, Harrus, Poland, Chomel & Pedersen, 1998), podendo originar uma anemia aguda e grave. Em torno dos 15

dias pós infecção (PI) registam-se, simultaneamente, os valores mais elevados de carga bacteriana e os valores mais baixos de hematócrito (Ht) (Tasker et al., 2009). Os sinais clínicos comuns em gatos com infecção aguda são a anemia e as suas manifestações clínicas, nomeadamente taquipneia, prostração, fraqueza, anorexia, mucosas pálidas e desidratação. O exame clínico do animal poderá ainda revelar uma esplenomegalia, associada provavelmente a hemólise extravascular e hematopoiese extramedular, e icterícia se ocorrer uma destruição massiva de eritrócitos (Tasker, 2010).

A infecção por *Mhf* também poderá originar quadros menos graves em que a anemia é ligeira. A infecção subclínica também está descrita. Este estado é reconhecido principalmente nos animais que recuperam de uma infecção aguda, podendo permanecer portadores assintomáticos mesmo perante um aumento da carga bacteriana (Willi et al., 2006). Estudos demonstraram que existe uma imunidade protetora quando ocorre uma reinfeção com *Mhf* (Hicks et al., 2015), enquanto que uma infecção por *Mhf* num animal previamente recuperado de uma infecção com *CMtc* se manifesta de forma mais aguda e grave que num animal que nunca tenha contactado com aquele agente (Baumman et al., 2015).

Regista-se flutuação nos valores de bacteriémia ao longo do tempo, principalmente durante os primeiros 20 dias PI (Tasker et al., 2009). Tal flutuação poderá dever-se a variações na expressão antigénica pelo agente, o que origina uma variação no reconhecimento antigénico por parte do sistema imunitário do animal infetado (Santos et al., 2011).

#### 2.7.2 “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”

Uma infecção por *CMhm* resulta, geralmente, em sinais clínicos leves ou num estado subclínico (Foley et al., 1998). A diminuição do Ht dá-se progressivamente até ao dia 20 PI (Tasker et al., 2009), e a infecção capaz de produzir doença ocorre geralmente em gatos doentes e não em animais saudáveis, o que torna pouco claro se o quadro clínico apresentado é devido à infecção por *CMhm* ou à doença associada. A coinfeção com vírus da leucemia felina (FeLV) ou vírus da imunodeficiência felina (FIV) pode originar uma diminuição mais acentuada da concentração de hemoglobina (George, Rideout, Griffey & Pedersen, 2002), assim como a imunossupressão secundária a quimioterapia. No entanto, alguns estudos identificaram animais com anemia que apresentavam apenas este agente como possível causador de doença (Reynolds & Lappin, 2007; Hornok et al., 2008). De acordo com estudos experimentais, o pico de bacteriémia ocorre aos 30 dias, verificando-se alguma flutuação nos valores de carga bacteriana em torno da quarta semana PI (Tasker et al., 2009).

#### 2.7.3. “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”

O *CMtc* é tido como um agente indutor de infecção subclínica ou com apresentação clínica ligeira, caracterizada por palidez e letargia (Willi et al., 2005), sendo que os valores de Ht diminuem

de forma progressiva até ao vigésimo dia PI (Tasker et al., 2009). No entanto, o potencial patogénico deste agente está dependente de fatores como a coinfeção por outros hemoplasmas ou a imunossupressão após administração de glucocorticóides (Willi et al., 2005). Estudos experimentais reportaram a eliminação espontânea do agente (Willi et al., 2005; Tasker et al., 2009).

#### 2.7.4. O estado de portador

Os animais podem tornar-se portadores crónicos assintomáticos de hemoplasmas, mesmo após tratamento com antibiótico eficaz a debelar o carácter clínico da infeção. Tal poderá originar a reativação da doença e reaparecimento da sintomatologia associada (Weingart, Tasker & Kohn, 2016). Diversos estudos identificaram casos de animais assintomáticos infetados por todas as espécies de hemoplasmas felinos, determinados por reação em cadeia da polimerase (PCR) (Willi et al., 2006; Sykes, Drazenovich, Ball & Leutenegger, 2007; Bauer et al., 2008).

### 2.8. Alterações Laboratoriais

#### 2.8.1 Hematologia

As alterações laboratoriais decorrentes da infeção por hemoplasmas estão descritas por vários autores, sendo as alterações hematológicas as mais comuns. Em animais infetados por hemoplasmas, verifica-se uma diminuição significativa do Ht em comparação com animais saudáveis. No entanto, tal como referido anteriormente, é na infeção por *Mhf* que tais alterações se tornam mais marcadas, podendo o Ht atingir um valor inferior a 15%, onde se assiste a diminuição significativa da concentração de hemoglobina, do número de eritrócitos, e a um aumento do volume corpuscular médio (Tasker et al., 2009; Ghazisaeedi et al., 2014; Santos et al., 2014; Diaz-Reganon et al., 2018). As infeções por *CMhm* ou *CMtc* resultam, geralmente, em alterações menos marcadas ou não significativas nos eritrócitos. A infeção por hemoplasmas não origina geralmente alteração dos leucócitos (Baumann et al., 2013).

#### 2.8.2. Bioquímica Sanguínea

Alguns estudos demonstram um aumento das enzimas hepáticas, hiperbilirrubinemia, hiperproteinemia, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia e diminuição do colesterol total (Tasker, 2010; Baumann et al., 2013; Sugiarto et al., 2016).

#### 2.8.3. Análise de urina

Ainda que menos comum, a hemoglobinúria poderá estar presente, associada a um processo de hemólise intravascular (Willi et al., 2005).

#### 2.8.4. Teste de Coombs

Animais infectados por *Mhf* apresentam resultados positivos no teste de Coombs ao fim de uma semana para aglutininas frias e ao fim de três semanas para aglutininas quentes. De notar que a positividade no teste de Coombs dá-se posteriormente ao início da diminuição do hematócrito (Tasker et al., 2009).

#### 2.8.5. Esfregaço sanguíneo

Na análise de esfregaço sanguíneo, dependendo da fase da infeção, poderão ser observados sinais de anemia imunomediada, incluindo aglutinação de eritrócitos e esferócitos, e sinais de uma resposta regenerativa da série eritrocitária, nomeadamente aumento da contagem de reticulócitos, anisocitose e policromasia (Foley et al., 1998; Hammer & Wellman, 1999; Willi et al., 2007b; Baumann et al., 2013).

### 2.9. Diagnóstico

O diagnóstico de Hemoplasmose é realizado considerando a sintomatologia apresentada pelo animal e os exames complementares, como a identificação do agente através da análise de esfregaço sanguíneo ou por deteção molecular, nomeadamente a PCR (Strait & Madsen, 2013).

Através da observação do esfregaço sanguíneo, com coloração de *Romanowsky*, é possível observar pequenas estruturas cocóides isoladas ou em pares na superfície dos eritrócitos (Tasker & Lappin, 2002). No entanto, quando comparado com o método de PCR, a análise citológica do esfregaço sanguíneo apresenta uma sensibilidade baixa e não permite a diferenciação das diferentes espécies de hemoplasmas (Westfall, Jensen, Reagan, Radecki & Lappin, 2001; Ghazisaeedi et al., 2014). A deteção do agente por PCR permite, assim, maior especificidade e sensibilidade, permitindo demonstrar a presença do agente, mesmo em animais assintomáticos (Foley et al., 1998). Todos os testes de PCR são baseados na amplificação de genes da subunidade 16S do RNA ribossómico do hemoplasma, e podem ser realizados em sangue total ou em tecidos (Berent et al., 1998; Foley et al., 1998; Santos et al., 2009). A técnica de PCR em tempo real traz vantagens sobre a técnica de PCR convencional no que respeita ao aumento de especificidade e à possibilidade de quantificação de DNA do hemoplasma na amostra, o que permite aferir tanto a significância de um resultado PCR positivo assim como monitorizar a resposta ao tratamento (Tasker, Helps, Day, Gruffydd-Jones & Harbour, 2003).

## 2.10. Tratamento

Várias opções de tratamento têm sido estudadas, sendo que umas são mais consensuais que outras. A ausência de parede celular bacteriana nos hemoplasmas inviabiliza a utilização de antibióticos da classe das Penicilinas. Por outro lado, o recurso a antibióticos como a Doxiciclina, Enrofloxacina, Marbofloxacina e a Pradofloxacina diminuem a carga bacteriana, estando documentadas diferenças na resposta ao tratamento antibiótico nas diferentes espécies (Dowers, Olver, Radecki & Lappin, 2002; Tasker et al., 2004; Tasker et al., 2006; Reynolds & Lappin, 2007; Dowers, Tasker, Radecki & Lappin, 2009).

A antibioterapia com Doxiciclina é a opção mais consensual para tratamento da Hemoplasmose. Embora esteja demonstrado que na maior parte das vezes este fármaco não elimina o *Mhf* (Baumann et al., 2013), diminui a carga bacteriana e permite um aumento do Ht durante e após o tratamento. A Doxiciclina também se mostrou eficaz no tratamento da infeção por *CMtc*, com estudos a evidenciar resultados de PCR negativos ao fim de duas semanas de tratamento, e um ano após o fim do ciclo de antibioterapia (Museux et al., 2009). Em relação à infeção por *CMhm*, existem resultados contraditórios, estando documentada ineficácia relativamente a este agente infeccioso (Reynolds & Lappin, 2007).

Mais recentemente foi estabelecido um protocolo terapêutico que permitiu a eliminação de *Mhf* com sucesso, através da administração de um ciclo de Doxiciclina (10 mg/kg sid ou 5mg/kg bid durante 28 dias), seguido de um ciclo de Marbofloxacina (2mg/kg sid durante 14 dias) (Novacco et al., 2018).

As desvantagens documentadas acerca da utilização de Doxiciclina prendem-se com o desenvolvimento de esofagite e estrituras esofágicas com a administração oral do fármaco que será tanto maior quanto maior for a acidez da formulação utilizada (German et al., 2005). Assim sendo, está recomendada a utilização de formulações menos ácidas como a Doxiciclina monohidratada ou então o recurso a formulações em pasta.

A Enrofloxacina, utilizada na dose de 5mg/kg/dia durante duas semanas, demonstrou capacidade em diminuir a carga bacteriana e na melhoria dos sinais clínicos nas infeções por *Mhf* (Dowers et al., 2002). O risco do recurso a este fármaco tem a ver com a possibilidade de desenvolvimento de degenerescência da retina e cegueira se utilizado numa dosagem superior a 5mg/kg/dia em gatos (Gelatt et al., 2001).

Como já referido, a técnica de PCR em tempo real permite a monitorização da eficácia da antibioterapia. Está demonstrada a reemergência do agente após o fim da antibioterapia e, assim, fará sentido a utilização desta técnica antes do início do tratamento. Um resultado PCR negativo após tratamento não descarta a possibilidade de se vir a desenvolver uma infeção crónica com resultados PCR positivos em determinações posteriores (Weingart, Tasker & Kohn, 2016). Assim sendo, o

significado de um resultado PCR positivo deverá sempre ser avaliado conjuntamente com os dados clínicos e laboratoriais.

A utilização de glucocorticóides no tratamento da infeção por hemoplasmas em gatos é controversa, não havendo, até ao momento, estudos controlados cegos para avaliar os seus efeitos. A resolução do quadro clínico associado a uma infeção por hemoplasmas sem o recurso a estes fármacos está descrito (Tasker et al., 2009). Contrariamente, o uso de glucocorticóides está associado à reemergência do agente bacteriano, e foi demonstrado que a imunodepressão com acetato de metilprednisolona prévia à infeção por *CMtc* resultou no desenvolvimento de uma anemia mais grave (Willi et al., 2005). Para além disso, infeções provocadas por herpesvírus ou calicivírus podem ser exacerbadas como consequência do tratamento com recurso a estes fármacos. Assim sendo, a utilização de glucocorticóides deverá ser restrita ao período em que o diagnóstico de hemoplasmose ainda não é definitivo e em que o diagnóstico de uma anemia hemolítica imunomediada é fortemente suspeito (Willi et al., 2007b).

Ao longo do curso da doença, e de acordo com sinais como anorexia e desidratação, poderá ser necessário estabelecer um plano de fluidoterapia (Tasker et al., 2009). No caso de anemias severas, poderá ser também necessário realizar transfusão de sangue, tendo o cuidado de que deverá ser sempre feito despiste por PCR para *Mhf* (sendo opcional o despiste para *CMhm* e *CMtc*) no animal dador devido à possibilidade de ser portador assintomático (Wardrop et al., 2016).

### **3. Trabalho experimental**

#### **3.1. Materiais e Métodos**

O presente estudo foi aprovado pelo Conselho Científico da Escola Universitária Vasco da Gama, Coimbra, Portugal. Todos os proprietários deram o consentimento informado para a inclusão dos seus animais no presente estudo.

Foram analisadas amostras de sangue total de gatos domésticos (n = 67) colhidas na Clínica Veterinária “Casa dos Animais”, em Luanda, Angola, entre Maio de 2014 e Fevereiro de 2016. Na data da colheita, através de questionário, foram obtidos os seguintes dados dos animais: idade, género, estado reprodutivo, raça, estado clínico (saudável ou doente, baseado no exame clínico), estilo de vida (*indoor*, *outdoor* ou misto), convivência com outros animais, presença ou história de infestação por parasitas externos e estado de infeção por retrovírus (FIV e/ou FeLV) (Apêndice 1). A caracterização dos animais incluídos no estudo é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 – Caracterização da população de gatos incluídos no estudo

	n	%
<b>Género</b>		
Macho	28	41,2%
Fêmea	39	58,2%
<b>Idade</b>		
< 2 anos	51	76,1%
2 a 8 anos	12	17,9%
> 8 anos	3	4,5%
<b>Estilo de vida</b>		
<i>Indoor</i>	22	32,8%
<i>Indoor e outdoor</i>	27	40,1%
<i>Outdoor</i>	18	26,7%
<b>Ectoparasitas</b>		
Pulgas	4	6,0%
Carraças	0	0,0%
<b>Retrovirus</b>		
FIV	0	0,0%
FeLV	0	0,0%

FIV – *Feline Immunodeficiency Virus*; FeLV – *Feline Leukemia Virus*

As amostras de sangue foram obtidas através de venopunção jugular ou cefálica, e armazenadas em tubos com EDTA e em tubos sem anticoagulante, para posterior separação do soro. As amostras de sangue total e de soro foram armazenadas a -20°C até se proceder à extração de DNA.

A extração de DNA foi realizada a partir de amostras de sangue total através da utilização de kit comercial (Citogene Kit de Purificação de DNA Genómico®, Citomed, Lisboa, Portugal), de acordo com instruções do fabricante.

A amplificação de ADN por PCR convencional foi realizada no termociclador T-100 da Bio-Rad® utilizando o protocolo que permite a amplificação de uma sequência parcial do gene 16s rRNA dos micoplasmas hemotrópicos felinos (Jensen et al., 2001), a partir da utilização dos *primers* F-ACGAAAGTCTGATGGAGCAATA e R-ACGCCCAATAAATCCGRATAAT, da amostra de ADN e de kit comercial (Kit GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase), de acordo com instrução do fabricante.

Os amplímeros foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% durante 15 minutos a 100V. O produto final foi observado no BioDocAnalyse da Biometra®.

A Sequenciação Genética foi realizada no Instituto de Patologia e Imunologia Molecular (IPATIMUP) da Universidade do Porto, utilizando como indicadores de sequenciação as mesmas sequências iniciadoras utilizadas na amplificação de ADN. A análise das sequências nucleotídicas obtidas foi elaborada através da comparação pela ferramenta on-line BLAST (do Inglês *Basic Local Alignment Search Tool*), com sequências depositadas no GenBank (disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Um nível de homologia igual ou superior a 99% foi aceite como indicativo de elevado grau de confiança.

Devido ao reduzido número de animais infetados detetados na presente amostra, não foi realizada análise estatística para deteção de fatores de risco de infeção por micoplasmas hemotrópicos, tendo sido realizada uma descrição das características dos animais infetados.

### **3.2. Resultados**

Das 67 amostras testadas, foi detetada a infeção por *Mycoplasma* spp. em quatro amostras (# 53, # 55, # 79 e # 80), revelando numa prevalência de infeção de 6.0%. A Sequenciação Genética dos produtos amplificados permitiu concluir que estes quatro animais se encontravam infetados com “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”.

A amostra “53” corresponde a um gato macho, de 12 meses de idade, não castrado, de raça indefinida. Apresentou-se como saudável à consulta médico-veterinária. Não tinha historial de infestação por ectoparasitas. Considerado como gato de interior com acesso ao exterior, contactava regularmente com outros gatos.

A amostra “55” corresponde a uma gata fêmea, de 8 meses de idade, não castrada, de raça indefinida. Apresentou-se como saudável à consulta médico-veterinária. Não tinha historial de infestação por ectoparasitas. Considerado como gato de interior com acesso ao exterior, não contactava regularmente com outros animais.

A amostra “79” corresponde a um gato macho, de 78 meses de idade, castrado, de raça indefinida. Apresentou-se à consulta médico-veterinária por perda de peso. Não tinha historial de infestação por ectoparasitas. Considerado como gato de interior com acesso ao exterior, contactava regularmente com outros gatos, cães e roedores.

A amostra “80” corresponde a uma gata fêmea, de 96 meses de idade, castrada, de raça indefinida. Apresentou-se à consulta médico-veterinária por perda de peso. Não tinha historial de infestação por ectoparasitas. Considerado como gato de exterior e com contacto com outros animais.

O reduzido número de animais infetados não permitiu estabelecer nenhuma associação estatisticamente significativa entre a infeção por *Mycoplasma* spp. e os diferentes fatores analisados



– género, idade, raça, estilo de vida, historial de infestação por ectoparasitas, infeção por FIV ou FeLV.

#### 4. Discussão

Que tenhamos conhecimento, este é o primeiro estudo epidemiológico que descreve a infeção por *Mycoplasma* spp. em gatos de Angola. No presente estudo foram identificados, através da técnica de PCR convencional e posterior Sequenciação Genética, quatro animais infetados com “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” de uma amostra de 67 animais, o que resulta numa prevalência de *Mycoplasma* spp. de 6.0%. Os valores encontrados no presente estudo são semelhantes aos encontrados noutros estudos (Kamrani et al., 2008; Bortoli et al., 2012). No entanto, os resultados obtidos aparentam ser relativamente baixos quando confrontados com diversos estudos de prevalência já realizados a nível global, em que estão descritas prevalências tão elevadas como 43,4% em Portugal (Martinez-Díaz et al., 2013). Que tenhamos conhecimento, apenas um outro estudo avaliou a prevalência de infeção felina por hemoplasmas no continente africano, no qual foi descrita uma prevalência de infeção de 25,5% em gatos da África do Sul (Lobetti & Lappin, 2012).

No entanto, deverá ser notado o facto de que não existe uma padronização nas diversas amostras estudadas o que torna a comparação entre resultados difícil, sendo que na maioria dos estudos as prevalências apontadas reportam-se a amostras onde estão incluídos animais domésticos e errantes (Martinez-Díaz et al., 2013), ou apenas animais doentes (Bauer et al., 2008; Lobetti & Lappin, 2012; Jenkins et al., 2013). De notar que no presente estudo foram incluídos apenas gatos domésticos. Dos 67 gatos incluídos no estudo, 61 animais foram considerados saudáveis no momento de apresentação à consulta Médico Veterinária. Já dos seis animais considerados como doentes, dois estavam infetados com *Mycoplasma* spp. Devido ao reduzido número de animais infetados, não foi possível fazer um estudo no sentido de identificar fatores de risco associados à infeção por hemoplasmas em gatos de Luanda, Angola.

Estudos futuros, incluindo gatos errantes, deverão ser realizados no sentido de determinar a prevalência de infeção em gatos com este estilo de vida. A prevalência de infeção será, provavelmente, superior em animais de rua do que em animais estritamente *indoor*, ou *indoor* com acesso ao exterior, uma vez que estes animais estão mais expostos a fatores de risco já identificados noutros estudos, nomeadamente interações agressivas e infestações por ectoparasitas. Tais diferenças de prevalência foram já demonstradas noutros estudos, em que a prevalência de infeção aumentou de 4.0% em animais domésticos para 60.0% numa amostra com apenas animais errantes (Kamrani et al., 2008).

## 5. Conclusão

A prevalência de *Mycoplasma* spp. detetada na população em estudo foi de 6.0%. Embora o resultado se afigure como sendo relativamente baixo, quando comparado com estudos de prevalência já realizados noutras áreas geográficas, a interpretação deve ser cuidada na medida em que a amostra estudada apresenta características que, à partida, lhe conferem menor risco de exposição aos agentes em estudo. Ainda assim, o presente estudo descreve, pela primeira vez a infeção por micoplasmas hemotrópicos em animais de Angola. O número reduzido de animais infetados não tornou possível a investigação de fatores de risco associados à infeção.

## 6. Referências Bibliográficas

- Barker, E., Tasker, S. (2013). Haemoplasmas: Lessons learnt from cats. *New Zealand Veterinary Journal*, 61(4), 184-192. doi:10.1080/00480169.2013.771760
- Bauer, N., Balzer, H., Thure, S., Moritz, A. (2008). Prevalence of feline haemotropic mycoplasmas in convenience samples of cats in Germany. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 10, 252-258. doi:10.1016/j.jfms.2007.12.004
- Baumann, J., Novacco, M., Riond, B., Boretti, F., Hofmann-Lehmann, R. (2013). Establishment and characterization of a low-dose *Mycoplasma haemofelis* infection model. *Veterinary Microbiology*, 167, 410-416. doi:10.1016/j.vetmic.2013.07.033
- Baumann, J., Novacco, M., Willi, B., Riond, B., Meli, M., Boretti, F., Hofmann-Lehmann, R. (2015). Lack of cross-protection against *Mycoplasma haemofelis* infection and signs of enhancement in “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” recovered cats. *Veterinary Research*, 46,104. doi:10.1186/s13567-015-0240-x
- Bergmann, M., Englert, T., Stuetzer, B., Hawley J., Lappin, M., Hartmann, K. (2017). Risk factors of different hemoplasma species infections in cats. *BMC Veterinary Research*, 13, 52. doi:10.1186/s12917-017-0953-3
- Berent, L., Messick, J., Cooper, S. (1998). Detection of *Haemobartonella felis* in cats with experimentally induced acute and chronic infections, using a polymerase chain reaction assay. *American Journal of Veterinary Research*, 59 (10), 1215-1220.
- Bortoli, C. P. de, André, M. R., Seki, M. C., Pinto, A. A., Machado, S. de T. Z., & Machado, R. Z. (2012). Detection of hemoplasma and Bartonella species and co-infection with retroviruses in cats subjected to a spaying/neutering program in Jaboticabal, SP, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 21(3), 219–223. doi:10.1590/s1984-29612012000300008
- Díaz-Regañón, D., Villaescusa, A., Ayllón, T., Rodríguez-Franco, F., García-Sancho, M., Agulla, B., Sainz, Á. (2018). Epidemiological study of hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) in cats from central Spain. *Parasites & Vectors*, 11, 140. doi:10.1186/s13071-018-2740-9
- Dowers, K. L., Olver, C., Radecki, S. V., & Lappin, M. R. (2002). Use of enrofloxacin for treatment of large-form *Haemobartonella felis* in experimentally infected cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 221(2). 250–253. doi:10.2460/javma.2002.221.250

- Dowers, K. L., Tasker, S., Radecki, S. V., & Lappin, M. R. (2009). Use of pradofloxacin to treat experimentally induced *Mycoplasma hemofelis* infection in cats. *American Journal of Veterinary Research*, 70(1), 105–111. doi:10.2460/ajvr.70.1.105
- Duarte, A., Marques, V., Correia, J., Neto, I., Bráz, B., Rodrigues, C., Martins, T., Rosado, R., Ferreira, J., Santos-Reis, M., Tavares, T. (2014). Molecular detection of haemotropic Mycoplasma species in urban and rural cats from Portugal. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 1-7. doi:10.1177/1098612X14550172
- Fard, R., Vahedi, S., Mohammadkhan, F. (2014). Haemotropic mycoplasmas (haemoplasmas): a review. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2 (5), 1484-1503.
- Foley, J., Harrus, S., Poland, A., Chomel, B., Pedersen, N. (1998). Molecular, clinical, and pathologic comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats. *American Journal of Veterinary Research*, 59(12), 1581-1588.
- Gary, A., Richmond H., Tasker, S., Hackett, T., Lappin, M. (2006). Survival of *Mycoplasma haemofelis* and ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ in blood of cats used for transfusions. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 8, 321-326. doi:10.1016/j.jfms.2006.04.005
- Gelatt, K. N., van der Woerd, A., Ketrang, K. L., Andrew, S. E., Brooks, D. E., Biros, D. J., ... Cutler, T. J. (2001). Enrofloxacin-associated retinal degeneration in cats. *Veterinary Ophthalmology*, 4(2), 99–106. doi:10.1046/j.1463-5224.2001.00182.x
- Gentilini, F., Novacco, M., Turba, M., Willi, B., Bacci, M., Hofmann-Lehmann, R. (2009). Use of combined conventional and real-time PCR to determine the epidemiology of feline haemoplasma infections in northern Italy. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11, 277-285. doi:10.1016/j.jfms.2008.06.008
- George, J. W., Rideout, B. A., Griffey, S. M., & Pedersen, N. C. (2002). Effect of preexisting FeLV infection or FeLV and feline immunodeficiency virus coinfection on pathogenicity of the small variant of *Haemobartonella felis* in cats. *American Journal of Veterinary Research*, 63(8), 1172–1178. doi:10.2460/ajvr.2002.63.1172
- German, A., Cannon, M., Dye, C., Booth, M., Pearson, G., Reay, C., Gruffydd-Jones, T. (2005). Oesophageal strictures in cats associated with doxycycline therapy. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 7, 33-41. doi:10.1016/j.jfms.2004.04.001
- Ghazisaeedi, F., Atyabi, N., Salehi, T., Gentilini, F., Tamai, I., Akbarein, H., Tasker, S. (2014). A molecular study of hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) in cats in Iran. *Veterinary Clinical Pathology*, 43 (3), 381–386. doi:10.1111/vcp.12166

- Hammer, A., & Wellman, M. (1999). Leukoerythroblastosis and normoblastemia in the cat. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 35(6), 471–473. doi:10.5326/15473317-35-6-471
- Hicks, C., Willi, B., Riond, B., Novacco, M., Meli, M., Stokes, C., Helps, C., Hofmann-Lehmann, R., Tasker, S. (2015). Protective immunity against infection with *Mycoplasma haemofelis*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 22, 108-118. doi:10.1128/CVI.00581-14.
- Hornok, S., Meli, M., Gönczi, E., Ignits, É., Willi, B., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. (2008). First molecular identification of “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” from a cat with fatal haemolytic anaemia in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*, 56(4), 441–450. doi:10.1556/avet.56.2008.4.2
- Jenkins, K., Dittmer, K., Marshall, J., Tasker, S. (2013). Prevalence and risk factor analysis of feline haemoplasma infection in New Zealand domestic cats using a real-time PCR assay. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 15 (12), 1063–1069. doi:10.1177/1098612X13488384
- Jensen, W., Lappin, M., Kamkar, S., Reagan, W. (2001). Use of a polymerase chain reaction assay to detect and differentiate two strains of *Haemobartonella felis* in naturally infected cats. *American Journal of Veterinary Research*, 62(4), 604-608. doi:10.2460/ajvr.2001.62.604
- Kamrani, A., Parreira, V., Greenwood, J., Prescott, J. (2008). The prevalence of *Bartonella*, hemoplasma, and *Rickettsia felis* infections in domestic cats and in cat fleas in Ontario. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 72, 411–419.
- Lobetti, R., Lappin, M. (2012). Prevalence of *Toxoplasma gondii*, *Bartonella* species and haemoplasma infection in cats in South Africa. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 14 (12), 857-862. doi:10.1177/1098612X12452495
- Maede, Y., Hata, R., (1975). Studies on Feline Haemobartonellosis II - The Mechanism of Anemia Produced by Infection with *Haemobartonella felis*. *The Japanese Journal of Veterinary Science*, 37, 49-54. doi:10.1292/jvms1939.37.49
- Martínez-Díaz, V., Silvestre-Ferreira, A., Vilhena, H., Pastor, J., Francino, O., Altet, L. (2013). Prevalence and co-infection of haemotropic mycoplasmas in portuguese cats by Real-time Polymerase Chain Reaction. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 15(10), 879-885. doi:10.1177/1098612X13480985
- Messick, J. (2004). Hemotropic Mycoplasmas (Hemoplasmas): A review and new insights into pathogenic potential. *Journal of Veterinary Clinical Pathology*, 33, 2-13. doi:10.1111/j.1939-165X.2004.tb00342.x
- Messick, J. B., & Harvey, J. W. (2011). Hemotropic Mycoplasmosis (Hemobartonellosis) Greene - Infectious Diseases of the Dog and Cat (4th ed., pp. 310-319): Elsevier/Saunders.

- Miceli, N., Gavioli, F., Gonçalves, L., André, M., Sousa, V., Marques de Sousa, K., Machado, R. (2013). Molecular detection of feline arthropod-borne pathogens in cats in Cuiabá, state of Mato Grosso, central-western region of Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22 (3), 385-390. doi:10.1590/S1984-29612013000300011
- Museux, K., Boretti, F., Willi, B., Riond, B., Hoelzle, K., Hoelzle, L., Wittenbrink, M., Tasker, S., Wengi, N., Reusch, C., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R. (2009). In vivo transmission studies of 'Candidatus *Mycoplasma turicensis*' in the domestic cat. *Veterinary Research*, 40:45. doi:10.1051/vetres/2009028
- Neimark, H., Johansson, K-E., Rikihisa, Y., Tully, J. (2001). Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of 'Candidatus *Mycoplasma haemofelis*', 'Candidatus *Mycoplasma haemomuris*', 'Candidatus *Mycoplasma haemosuis*' and 'Candidatus *Mycoplasma wenyonii*'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 891–899.
- Novacco, M., Sugiarto, S., Willi, B., Baumann, J., Spiri, A. M., Oestmann, A., Riond, B., Boretti, F., Naegeli, H., Hofmann-Lehmann, R. (2018). Consecutive antibiotic treatment with doxycycline and marbofloxacin clears bacteremia in *Mycoplasma haemofelis* infected cats. *Veterinary Microbiology*, 217, 112–120. doi:10.1016/j.vetmic.2018.03.006
- Peters, I., Helps, C., Willi, B., Hofmann-Lehmann, R., Tasker, S. (2008). The prevalence of three species of feline haemoplasmas in samples submitted to a diagnostics service as determined by three novel real-time duplex PCR assays. *Veterinary Microbiology*, 126, 142–150. doi:10.1016/j.vetmic.2007.06.017
- Reynolds, C., Lappin, M. (2007). "Candidatus *Mycoplasma haemominutum*" Infections in 21. Client-Owned Cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 43, 249-257. doi:10.5326/0430249
- Roura, X., Peters, I., Altet, L., Tabar, M., Barker, E., Planellas, M., Helps, C., Francino, O., Shaw, S., Tasker, S. (2010). Prevalence of hemotropic mycoplasmas in healthy and unhealthy cats and dogs in Spain. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22, 270-274. doi:10.1177/104063871002200219
- Santos, A., Santos, R., Biondo, A., Dora, J., Goldani, L., Oliveira, S., Guimarães, A., Timenetsky, J., Morais, H., González, F., Messick, J. (2008). Hemoplasma Infection in HIV-positive Patient, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 14 (12), 1922-1924. doi:10.3201/eid1412.080964
- Santos, A., Messick, J., Biondo, A., Oliveira, S., Pedralli, V., Lasta, C., Lacerda, L., Esteves, V., Hofmann-Lehmann, R., Willi, B., González, F. (2009). Design, optimization, and application of a conventional PCR assay with an internal control for detection of *Candidatus Mycoplasma turicensis* 16S rDNA in domestic cats from Brazil. *Veterinary Clinical Pathology*, 38(4), 443–452. doi:10.1111/j.1939-165x.2009.00158.x

- Santos, A., Guimarães, A., Nascimento, N., SanMiguel, P., Martin, S., Messick, J. (2011). Genome of *Mycoplasma haemofelis*, unraveling its strategies for survival and persistence. *Veterinary Research*, 42, 102. doi:10.1186/1297-9716-42-102
- Santos, A., Conrado, F., Messick, J., Biondo, A., Oliveira, S., Guimaraes, A., Nascimento, N., Pedralli, V., Camila, L., González, F. (2014). *Hemoplasma prevalence and hematological abnormalities associated with infection in three different cat populations from Southern Brazil*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23(4), 428–434. doi:10.1590/s1984-29612014079
- Strait, E. L. & Madsen, M. L. (2013). Mollicutes. In: McVey, D. S., Kennedy, M. & Chengappa, M.M. (Eds.), *Veterinary Microbiology* (3a edição, pp 291). Wiley-blackwell.
- Sugiarto, S., Spiri, A., Riond, B., Novacco, M., Oestmann, A., de Miranda, L., Meli, M., Boretti, F., Hofmann-Lehmann, R., Willi, B. (2016). Passive immunization does not provide protection against experimental infection with *Mycoplasma haemofelis*. *Veterinary Research*, 47(1). doi:10.1186/s13567-016-0361-x
- Sykes, J., Bailiff, N., Ball, L., Foreman, O., George, J., Fry, M. (2004). Identification of a novel hemotropic mycoplasma in a splenectomized dog with hemic neoplasia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 224 (12), 1946-1951. doi:10.2460/javma.2004.224.1946
- Sykes, J. E., Drazenovich, N. L., Ball, L. M., & Leutenegger, C. M. (2007). *Use of Conventional and Real-Time Polymerase Chain Reaction to Determine the Epidemiology of Hemoplasma Infections in Anemic and Nonanemic Cats*. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(4), 685–693. doi:10.1111/j.1939-1676.2007.tb03009.x
- Sykes, J., Terry, J., Lindsay, L., Owens, S. (2008). Prevalences of various hemoplasma species among cats in the United States with possible hemoplasmosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 232 (3), 372-379. doi:10.2460/javma.232.3.372
- Sykes, J. (2010) Feline hemotropic mycoplasmas. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 20(1), 62–69. doi:10.1111/j.1476-4431.2009.00491.x
- Tanahara, M., Miyamoto, S., Nishio, S., Yoshii, Y., Sakuma, M., Sakata, Y., Nishigaki, K., Tsujimoto, H., Setoguchi, A., Endo, Y. (2010). An Epidemiological Survey of Feline Hemoplasma Infection in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72 (12), 1575-1581. doi:10.1292/jvms.10-0143
- Taroura, S., Shimada, Y., Sakata, Y., Miyama, T., Hiraoka, H., Watanabe, M., Itamoto, K., Okuda, M., Inokuma, H. (2005). Detection of DNA of ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ and *Spiroplasma* sp. in Unfed Ticks Collected from Vegetation in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 67(12), 1277-1279. doi:10.1292/jvms.67.1277

- Tasker, S., Lappin, M. (2002). *Haemobartonella felis*: recent developments in diagnosis and treatment. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 4, 3–11. doi:10.1053/jfms.2001.0155
- Tasker, S., Helps, C., Day, M., Gruffydd-Jones, T., Harbour, D. (2003). Use of Real-Time PCR To Detect and Quantify *Mycoplasma haemofelis* and “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” DNA. *Journal Of Clinical Microbiology*, 41 (1), 439–441. doi:10.1128/JCM.41.1.439–441.2003
- Tasker, S., Helps, C., Day, M., Harbour, D., Gruffydd-Jones, T., Lappin, M. (2004). Use of a Taqman PCR to determine the response of *Mycoplasma haemofelis* infection to antibiotic treatment. *Journal of Microbiological Methods*, 56(1), 63–71. doi:10.1016/j.mimet.2003.09.017
- Tasker, S., Caney, S., Day, M., Dean, R., Helps, C., Knowles, T., Lait, F., Pinches, M., Gruffydd-Jones, T. (2006). Effect of chronic feline immunodeficiency infection, and efficacy of marbofloxacin treatment, on “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” infection. *Microbes and Infection*. 8(3). 653–661. doi:10.1016/j.micinf.2005.08.015
- Tasker, S., Peters, I., Papasouliotis, K., Cue, S., Willi, B., Hofmann-Lehmann, R., Gruffydd-Jones, T., Knowles, T., Day, M., Helps, C. (2009). Description of outcomes of experimental infection with feline haemoplasmas: Copy numbers, haematology, Coombs’ testing and blood glucose concentrations. *Veterinary Microbiology*, 139, 323–332. doi:10.1016/j.vetmic.2009.06.028
- Tasker, S. (2010). Haemotropic mycoplasmas: what's their real significance in cats?. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12 (15), 369–381. doi:10.1016/j.jfms.2010.03.011
- Vergara, R., Galleguillos, F., Jaramillo, M., Almosny, N., Martínez, P., Behne, P., Acosta-Jamett, G., Müller, A. (2016). Prevalence, risk factor analysis, and hematological findings of hemoplasma infection in domestic cats from Valdivia, Southern Chile. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 46, 20–26. doi:10.1016/j.cimid.2016.03.004
- Wardrop, K., Birkenheuer, A., Blais, M., Callan, M., Kohn, B., Lappin, M., Sykes, J. (2016). Update on Canine and Feline Blood Donor Screening for Blood-Borne Pathogens. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30, 15–35. doi:10.1111/jvim.13823
- Weingart, C., Tasker, S., Kohn, B. (2016). Infection with haemoplasma species in 22 cats with anaemia. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 18(2), 129–136. doi:10.1177/1098612x15573562
- Westfall, D. S., Jensen, W. A., Reagan, W. J., Radecki, S. V., & Lappin, M. R. (2001). Inoculation of two genotypes of *Hemobartonella felis* (California and Ohio variants) to induce infection in cats and the response to treatment with azithromycin. *American Journal of Veterinary Research*, 62(5), 687–691. doi:10.2460/ajvr.2001.62.687



- Willi, B., Boretti, F., Cattori, V., Tasker, S., Meli, M., Reusch, C., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R. (2005). Identification, molecular characterization, and experimental transmission of a new hemoplasma isolate from a cat with Hemolytic Anemia in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 2581-2585. doi:10.1128/JCM.43.6.2581-2585.2005
- Willi, B., Boretti, F., Baumgartner, C., Tasker, S., Wenger, B., Cattori, V., Meli, M., Reusch, C., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R. (2006a). Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (3), 961-969. doi:10.1128/JCM.44.3.961-969.2006
- Willi, B., Boretti, F., Meli, M., Bernasconi, M., Casati, S., Hegglin, D., Puorger, M., Neimark, H., Cattori, V., Wengi, N., Reusch, C., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R. (2007a). Real-Time PCR investigation of potential vectors, reservoirs, and shedding patterns of feline Hemotropic Mycoplasmas. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 3798-3802. doi:10.1128/AEM.02977-06
- Willi, B., Boretti, F., Tasker, S., Meli, M., Wengi, N., Reusch, C., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R. (2007b). From *Haemobartonella* to hemoplasma: Molecular methods provide new insights. *Veterinary Microbiology*, 125, 197-209. doi:10.1016/j.vetmic.2007.06.027
- Willi, B., Museux, K., Novacco, M., Schraner, E., Wild, P., Groebel, K., Ziegler, U., Wolf-Jackel, G., Kessler, Y., Geret, C., Tasker, S., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R. (2011). First morphological characterization of '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' using electron microscopy. *Veterinary Microbiology*, 149, 367-373. doi:10.1016/j.vetmic.2010.11.020
- Woods, J., Brewer, M., Hawley, J., Wisniewski, N., Lappin, M. (2005). Evaluation of experimental transmission of "*Candidatus Mycoplasma haemominutum*" and *Mycoplasma haemofelis* by *Ctenocephalides felis* to cats. *American Journal of Veterinary Research*, 66, 1008-1012. doi: 10.2460/ajvr.2005.66.1008
- Zulty, J., Kociba, G. (1990). Cold agglutinins in cats with haemobartonellosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 196, 907-910.

## **Apêndice 1 – Questionário**

DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

AMOSTRA Nº \_\_\_\_ C /20 \_\_\_\_ (CÃO)

AMOSTRA Nº \_\_\_\_ G/20 \_\_\_\_ (GATO)

**DADOS RELATIVOS AO ANIMAL**

1. Nome: \_\_\_\_\_ 2. Sexo: M ☐ F ☐ 3. Castrado: Não ☐ Sim ☐

4. Espécie: Canídeo ☐ Felídeo ☐ 5. Raça: \_\_\_\_\_

6. Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

7. Pelagem Curta ☐ Média ☐ Comprida ☐ Cor \_\_\_\_\_

8. O animal encontra-se doente? Não ☐ Sim ☐ Com: \_\_\_\_\_

8.1. Se Doente: Anorexia / Hiporexia ☐ Perda de peso ☐ Vômito / Diarreia ☐ Icterícia ☐  
Bilirrubinúria ☐ Hemoglobinúria ☐ Febre ☐ Desidratação ☐ Anemia ☐ Trombocitopenia  
☐ Leucocitose ☐ Leucopenia ☐ Alterações cutâneas ☐ Sinais oculares ☐ Unhas grandes ☐  
Linfadenopatia local/generalizada ☐ Tosse ☐ Dificuldades respiratórias ☐ Sinais  
neurológicos ☐

Outro: \_\_\_\_\_

9. Suspeita de doença transmitida por vetores: Não ☐ Sim ☐

10. História de infecção por: Pulgas ☐ Carraças ☐ Mosquitos ☐

11. Tem acesso a roedores (ratos, ratazanas, etc), aves? Não ☐ Sim ☐

12. Tem acesso a roedores a aves? Não ☐ Sim ☐

13. Tipo de habitação:

Apartamento ☐ Quinta ☐ Vivenda com/sem jardim ☐ Canil/gatil ☐

Outro \_\_\_\_\_ 11. Meio urbano ☐ Meio rural ☐

14. Hábitos de vida:

Vive exclusivamente no exterior ☐ Vive exclusivamente dentro de casa ☐

Vive dentro de casa mas tem acesso ao exterior ☐ Animal de rua (vadio) ☐

15. Alimentação (após a captura):

Caseira ☐ Ração seca ☐ Lata ☐

Carnes ou vísceras cruas e/ou mal cozinhadas ☐ De que animal? \_\_\_\_\_

16. Deslocações do animal:

Nenhuma ☐ Área de residência ☐

Várias regiões dentro do país ☐ Especificar: \_\_\_\_\_

Estrangeiro ☐ Especificar: \_\_\_\_\_

17. Vacinado? Não ☐ Sim ☐ Data da última vacina: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome comercial e laboratório: \_\_\_\_/\_\_\_\_

**18. Desparasitado:**

Internamente: Não ☐ Sim ☐ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome comercial e princípio activo: \_\_\_\_\_

Externamente: Não ☐ Sim ☐ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome comercial e princípio activo: \_\_\_\_\_

**19. Prevenção para dirofilariose:** Não ☐ Sim ☐

Fármaco e esquema terapêutico: \_\_\_\_\_

**20. Contacta com outros animais?** Não ☐ Sim ☐ Quais? \_\_\_\_\_

**21. Tem/teve alguma das seguintes doenças:**

**Cão:** Esgana ☐ Parvovirose ☐ Babesiose (febre da carraça) ☐ Leishmaniose ☐

Erliquiose ☐ Não sabe ☐

Se positivo indique teste (s) realizado (s): \_\_\_\_\_

**Gato:** Fiv ☐ Felv ☐ Pif ☐ Não sabe ☐

Se positivo indique teste (s) realizado (s): \_\_\_\_\_